

KAJIAN DEOXYRIBONUCLEIC ACID (DNA) BARCODE PADA SPESIES *Tarsius bancanus*, *Tarsius spectrum*, DAN *Tarsius diana* DENGAN MENGGUNAKAN GEN CYTOCHROME OXIDASE SUB-UNIT I (COX1)

Genetic Diversity Study of Gene Cytochrome Oxidase Subunit I (COX1) on Tarsius bancanus, Tarsius spectrum, and Tarsius diana

Alnita Baaka¹ dan Rini Widayanti²

¹Program Studi Magister Sain Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

E-mail: riniwida@yahoo.co.uk

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui keragaman genetik gen COX1 pada *Tarsius spectrum* (*T. spectrum*), *Tarsius diana* (*T. diana*), dan *Tarsius bancanus* (*T. bancanus*). Sampel yang digunakan adalah 4 sampel jaringan *T. spectrum* asal Sulawesi Utara, 1 sampel jaringan *T. diana* asal Sulawesi Tengah, 2 sampel jaringan *T. bancanus* asal Lampung, dan 3 sampel jaringan *T. bancanus* asal Kalimantan. Selanjutnya dilakukan isolasi deoxyribonucleic acid (DNA), amplifikasi dengan teknik polymerase chain reaction (PCR), pengurutan, dan data dianalisis menggunakan program MEGA v. 5.0. Hasil amplifikasi diperoleh produk PCR sebesar 1633 pasang basa (pb), hasil pengurutan DNA ditemukan 240 situs nukleotida dan 16 situs asam amino yang berbeda. Jarak genetika menggunakan Kimura-2 parameter paling tinggi 16,1%, paling kecil 0%, dan rata-rata 8,3%. Pohon filogenetika menggunakan metode Neighbor joining berdasarkan urutan nukleotida dan asam amino COX1 dapat membedakan antara *T. bancanus*, *T. spectrum*, dan *T. diana*, namun tidak dapat membedakan antara *T. bancanus* asal Kalimantan dan *T. bancanus* asal Lampung.

Kata kunci: *Tarsius sp.*, COX1, nukleotida, asam amino

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the genetic diversity of genes COX1 on *Tarsius spectrum* (*T. spectrum*), *Tarsius diana* (*T. diana*), and *Tarsius bancanus* (*T. bancanus*). The samples used were four tissue samples of *T. spectrum* from North Sulawesi, one tissue sample of *T. diana* from Central Sulawesi, two tissue samples of *T. bancanus* from Lampung, and three samples of tissue *T. bancanus* from Kalimantan. Samples were further isolated the DNA, amplified by PCR, sequenced, and the data were analyzed using the program MEGA v.5.0. The results of PCR amplification product obtained for 1633 base pairs (bp), DNA sequencing results found 240 nucleotide sites and 16 different amino acid sites. Genetic distances using the Kimura-2 parameter revealed that the highest was 16.1%, the smallest was 0%, and the average was 8.3%. Phylogenetic tree using the Neighbor joining method based on nucleotide and amino acid sequence of COX1 able to distinguish between *T. bancanus*, *T. spectrum*, and *T. diana*, but can not distinguish between *T. bancanus* from Kalimantan and *T. bancanus* from Lampung.

Key words: *Tarsius sp.*, COX1, nucleotides, amino acids

PENDAHULUAN

Tarsius merupakan primata terkecil di dunia (± 150 gram), memiliki bola mata besar, dan leher dapat memutar hingga 180°. Keberadaan satwa ini sebagai sumber keragaman hayati Indonesia sekarang mulai memprihatinkan karena semakin berkurangnya habitat yang ditempati dan juga pemanenan satwa sebagai hewan kesayangan. *Tarsius* merupakan satwa primata langka dan endemis Sulawesi yang dilindungi sejak tahun 1930, berdasarkan Undang-Undang No. 5/1990 dan PP No. 7/1999. Usaha untuk pelestarian satwa ini telah dilakukan melalui program pelestarian satwa baik secara *in situ* maupun *ex situ*. Namun karena satwa ini secara morfologis sulit dibedakan, maka diperlukan upaya untuk mendapatkan penanda genetika untuk masing-masing spesies *Tarsius* agar konservasi lebih terarah dan mencapai sasaran.

Kajian molekuler gen penyandi *12SrRNA* pada *Tarsius* telah dilakukan oleh Shekelle pada tahun 2003 dan daerah D-loop *Tarsius sp.* (Widayanti dan Solihin, 2007), namun karena homologinya tinggi maka urutan

fragmen deoxyribonucleic acid (DNA) mitokondria tersebut tidak dapat dijadikan penanda genetika. Widayanti *et al.* (2006) selanjutnya dapat menggunakan gen Cyt b dan gen ATP 8 sebagai penanda genetika walaupun hanya pada tingkat nukleotida saja (pada tingkat asam amino kurang mendukung). Selanjutnya pada tahun 2010, 2011, dan 2012 telah dilakukan kajian berturut-turut pada gen COX2, ND3, dan ND4L. Namun ketiga urutan gen tersebut tidak dapat digunakan sebagai penanda genetika ketiga spesies *Tarsius spectrum* (*T. spectrum*), *Tarsius diana* (*T. diana*), dan *Tarsius bancanus* (*T. bancanus*). Variabilitas yang terdapat pada nukleotida penyusun gen COX1 pada *Paragonimus westermani* (Park *et al.*, 2003), menyebabkan gen tersebut dapat digunakan sebagai pembeda atau sebagai penanda genetika antar spesies. Menurut Ozdil dan Ilhan (2012), bahwa gen COX1 dapat membedakan spesies *Apis mellifera* dan keragaman nukleotida dari pada gen COX1. Kane *et al.* (2008) mengatakan bahwa urutan gen tersebut merupakan metode terbaik untuk karakterisasi populasi dan spesies dalam genus *Bulinus* yang berasal dari

geografi yang berbeda. Gen *COX1* merupakan gen pada DNA mitokondria yang berperan dalam respirasi sel. Gen *COX1* terletak di antara gen *tRNA^{Tyr}* pada daerah *upstream* dan daerah gen *tRNA^{Ser}* pada daerah *downstream* (Schmitz *et al.*, 2002).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh para peneliti sebelumnya, maka masih dibutuhkan penelitian lanjutan untuk mendapatkan penanda genetika lain yang lebih spesifik untuk masing-masing spesies *Tarsius* dan diharapkan kajian keragaman genetik pada gen *COX1* *Tarsius* dapat untuk membedakan di antara spesies *Tarsius* sehingga konservasi satwa tersebut dapat bermanfaat dan berhasil guna.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan empat ekor *T. spectrum* asal Sulawesi Utara, satu ekor *T. diana* asal Sulawesi Tengah, dua ekor *Tarsius bancanus* asal Sumatra, dan tiga ekor *T. bancanus* asal Kalimantan Barat. Primer untuk mengamplifikasi gen *COX1* didesain berdasar urutan genom mitokondria *T. bancanus* dari Genbank (NC_002811), menggunakan program *primer 3 online*. Susunan primer, *melting* temperatur, dan besarnya produk *polymerase chain reaction* (PCR) disajikan pada Tabel 1.

Isolasi DNA Total

Deoxyribonucleic acid total diekstraksi dari jaringan. Jaringan disimpan dalam media RNA *latter* (Qiagen) untuk menjaga kerusakan DNA dari nuklease. Isolasi dan purifikasi DNA menggunakan DNA Isolation Kit (Qiagen).

Amplifikasi Gen COX1 dengan PCR

Total DNA hasil ekstraksi digunakan sebagai DNA cetakan untuk proses amplifikasi. Komposisi 25 µl campuran pereaksi PCR terdiri atas *Kapa Taq DNA polymerase, ready mix* (1st BASE) sebanyak 12,5 µl, 100-300 ng DNA cetakan, 10 pmol masing-masing primer dan ditambahkan *nuclease free water* (Microzone) hingga mencapai volume 25 µl.

Amplifikasi DNA dengan PCR pada penelitian ini menggunakan mesin *Invinigen* (Biotech, Inc.).

Amplifikasi gen *COX1* dilakukan dengan kondisi, denaturasi awal selama 5 menit pada suhu 94° C selanjutnya diikuti dengan 94° C selama 30 detik untuk denaturasi, 54° C selama 45 detik untuk penempelan primer (penganealan), 72° C selama 1 menit 30 detik untuk pemanjangan (*elongation*); amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus kemudian *post elongation* 5 menit pada 72° C.

Elektroforesis DNA dilakukan untuk deteksi DNA total hasil isolasi dan Produk PCR pada gel agarosa 1% yang telah ditambah dengan pewarna DNA Bioatlas ((1st BASE)), menggunakan bufer 1xTBE dalam piranti *submarine electrophoresis* (Hoefer, USA). Pengamatan dilakukan dengan UV transiluminator ($\lambda = 300$ nm). Penanda DNA dengan ukuran 1 kb (1st BASE) digunakan sebagai penunjuk berat molekul.

Pengurutan Gen COX1

Produk PCR hasil amplifikasi dipurifikasi, selanjutnya digunakan sebagai DNA cetakan untuk reaksi pengurutan DNA. Kondisi untuk reaksi pengurutan adalah sebagai berikut: denaturasi awal selama 5 menit pada suhu 94° C, selanjutnya diikuti dengan 94° C selama 30 detik, 54° C selama 45 detik, 72° C selama 1,5 menit; reaksi amplifikasi sebanyak 35 siklus kemudian diakhiri dengan penambahan (*extension*) selama 5 menit pada 72° C. Pengurutan DNA menggunakan alat pengurutan DNA otomatis *ABI Prism*. Pengurutan DNA dilakukan dua kali reaksi menggunakan primer *forward* dan *reverse* untuk semua sampel *Tarsius*.

Analisis Data

Data urutan gen *COX1* dan urutan DNA yang diperoleh dari *data base* Internasional dilakukan *multiple alignment* dengan program *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1994). Selain berdasarkan urutan nukleotida, gen *COX1* dianalisis berdasarkan urutan asam amino dari basa-basa yang diterjemahkan mengikuti *vertebrate mitochondrial translation code* dalam MEGA versi 5 (Nei dan Kumar, 2002). Jarak genetik dianalisis menggunakan metoda Kimura dua parameter dan pohon filogenetika menggunakan metode *Neighbor joining* dengan nilai *bootstrap* 1000 kali

Tabel 1. Urutan basa primer untuk mengamplifikasi gen *COX1 Tarsius sp.*

Target	F dan R	Urutan Basa	Tm (° C)	Produk PCR (pb)
COX1	COX1F (21nt) COX1R (21nt)	5' GCTCTTTCAGCCATTTTACCC 3' 5' GTGGTTATGAGGTTGGCTTGA 3'	60,09 59,99	1633
COX1 (parsial)	COX1AF (21nt) COX1AR (20nt)	5' GCTCTTTCAGCCATTTTACCC 3' 5' ATGCCTATGTAGCCGAATGG 3'	60,09 59,94	845
COX1 (parsial)	COX1BF (20nt) COX1BR (20nt)	5' TCCTTATTCTCCCCGGATTT 3' 5' TAGGGGGTTCAATTCTCTCC 3'	59,73 60,12	843

HASIL DAN PEMBAHASAN

Total DNA telah diisolasi dari 10 sampel *Tarsius*, kemudian digunakan sebagai cetakan untuk amplifikasi gen COX1. Amplifikasi sampel *T. bancanus* menggunakan primer COX1F dan COX1R, sedangkan untuk *T. spectrum* dan *T. diana*e menggunakan pasangan primer COX1AF dan COX1AR serta pasangan primer COX1BF dan COX1BR. Amplifikasi kedua *Tarsius* asal Sulawesi menggunakan dua pasang primer oleh karena jaringan yang sudah rusak sehingga saat isolasi DNA didapatkan DNA yang sudah terfragmentasi. Oleh karena itu untuk mendapatkan produk PCR sepanjang 1633 pb sangat sulit, sehingga diperlukan dua pasang primer untuk mendapatkan gen COX1 utuh. Hasil amplifikasi gen COX1 disajikan pada Gambar 1.

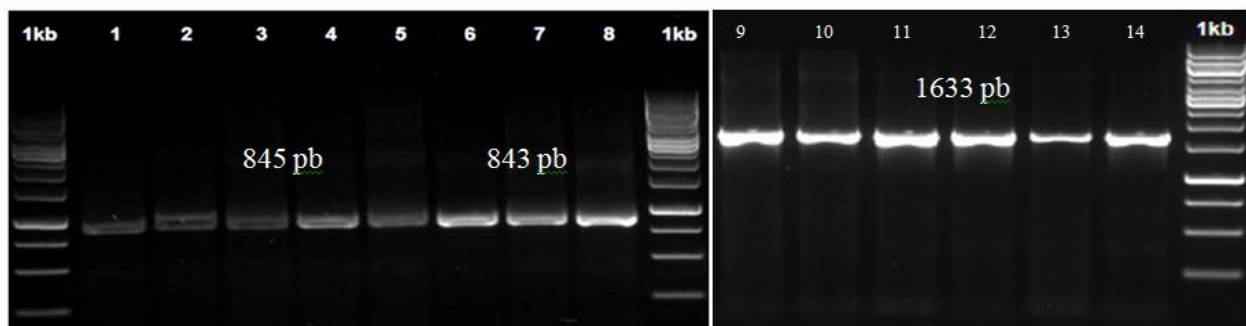
Panjang produk PCR menggunakan pasangan primer COX1F dan COX1R adalah 1633 pb, sedangkan panjang produk PCR menggunakan pasangan primer COX1AF-COX1AR dan COX1BF-COX1BR berturut-turut adalah 845 dan 843 pb. Letak penempelan ketiga pasang primer tersebut berdasar urutan *T. bancanus* dari Genbank (NC_002811), berturut-turut pada urutan basa ke 5321-5341 dan 6953-6933; 5321-5341 dan 6165-6146; 6081-6100 dan 6923 - 6904.

Produk PCR sepanjang 1633 pb pada *T. bancanus*, hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer COX1F dan COX1R, serta produk PCR sepanjang 845 dan 843 pb pada *T. diana*e dan *T. spectrum* (menggunakan

pasangan primer COX1AF, COX1AR dan COX1BF; COX1BR) kemudian dilakukan *multiple alignment* menggunakan CLUSTAL W dengan pembandingan urutan genom mtDNA *T. bancanus* (Schmitz *et al.*, 2002). Hasil *multiple alignment* diperoleh panjang urutan gen COX1 sebesar 1542 nukleotida (urutan basa ke 5348-6889), yang akan menyandi 514 asam amino.

Hasil analisis urutan gen COX1 berdasar urutan nukleotida dan asam amino ditemukan berturut-turut 240 dan 16 situs yang berbeda. Berdasarkan pada situs nukleotida yang berbeda dengan menggunakan metoda Kimura 2 parameter yang ada di dalam program MEGA v.5 dapat diketahui jarak genetika antar *T. bancanus*, *T. diana*e dan *T. spectrum*, seperti disajikan pada Tabel 2. Berdasar situs asam amino yang berbeda dapat diketahui jumlah asam amino yang berbeda di antara sepuluh sampel *Tarsius* yang diteliti. Matriks perbedaan asam amino disajikan pada Tabel 2.

Pada Tabel 2, terlihat jarak genetika paling kecil adalah 0%, yaitu antara *T. bancanus* 3 asal Kalimantan dan *T. bancanus* 8 asal Lampung, sedangkan jarak genetika paling besar adalah 16,1% yaitu ,antara *T. spectrum* 11 terhadap *T. bancanus* K2, *T. bancanus* K3. dan *T. bancanus* L8. Rata-rata jarak genetika dari ketiga spesies *tarsius* tersebut adalah 8,3%. Perbedaan asam amino dari kesepuluh sampel *Tarsius* paling besar adalah 14 asam amino, yaitu antara *T. spectrum* 11 terhadap *T. bancanus* K3, *T. bancanus* L4 dan *T. bancanus* L8, paling kecil adalah 0 (nul) atau tidak ada perbedaan



Gambar 1. Hasil PCR gen COX1 menggunakan primer COX1F dan COX1R; COX1AF dan COX1AR; COX1BF dan COX1BR pada gel agarose 1% (1-4 menggunakan primer COX1AF dan COX1AR, 5-8 menggunakan primer COX1BF dan COX1BR, 9-14 menggunakan primer COX1F dan COX1R 1,5: *T. diana*e; 2,3,4,6,7,8: *T. spectrum*; 9,10,11: *T. bancanus* asal Kalimantan; 12,13,14: *T. bancanus* asal Lampung; 1 kb: DNA ladder 1 kb).

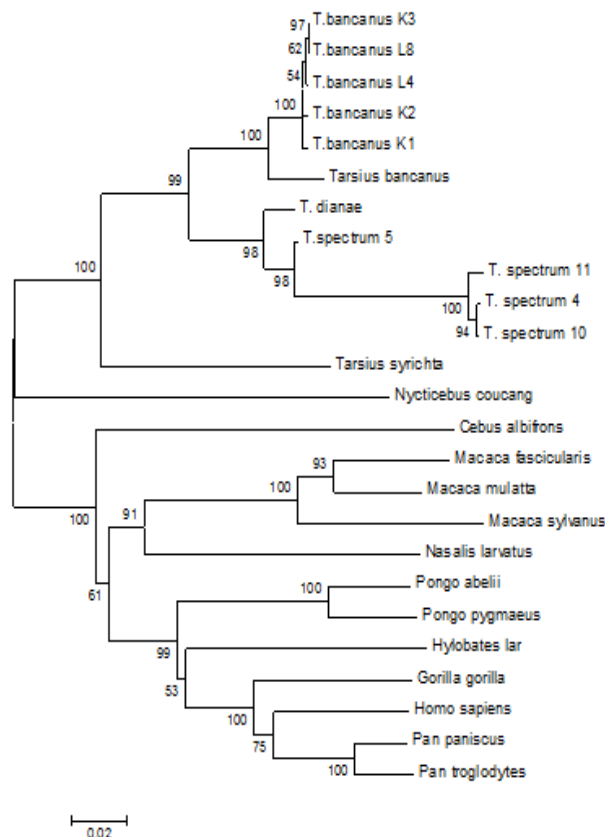
Tabel 2. Jarak genetika *Tarsius spectrum* (*T. spectrum*), *Tarsius diana*e (*T. diana*e), dan *Tarsius bancanus* (*T. bancanus*) berdasarkan urutan nukleotida gen COX1 (1544 nt) menggunakan metode Kimura 2 parameter dan matriks perbedaan asam amino (514 asam amino)

No.	Nama	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	<i>T.bancanus K1</i>		2	2	0	2	9	6	9	12	7
2	<i>T.bancanus K2</i>	0.005		0	2	0	11	8	11	14	9
3	<i>T.bancanus K3</i>	0.005	0.003		2	0	11	8	11	14	9
4	<i>T.bancanus L4</i>	0.005	0.005	0.002		2	9	6	9	12	7
5	<i>T.bancanus L8</i>	0.005	0.003	0.000	0.002		11	8	11	14	9
6	<i>T.spectrum 4</i>	0.156	0.156	0.158	0.157	0.158		3	0	3	6
7	<i>T.spectrum 5</i>	0.081	0.079	0.082	0.081	0.082	0.070		3	6	3
8	<i>T.spectrum 10</i>	0.157	0.157	0.159	0.158	0.159	0.003	0.068		3	6
9	<i>T.spectrum 11</i>	0.160	0.159	0.161	0.161	0.161	0.011	0.070	0.009		9
10	<i>T.diana</i> e	0.079	0.077	0.078	0.077	0.078	0.093	0.022	0.092	0.091	

K= Kalimantan, L= Lampung, kiri bawah: jarak genetika; kanan atas: matriks perbedaan asam amino

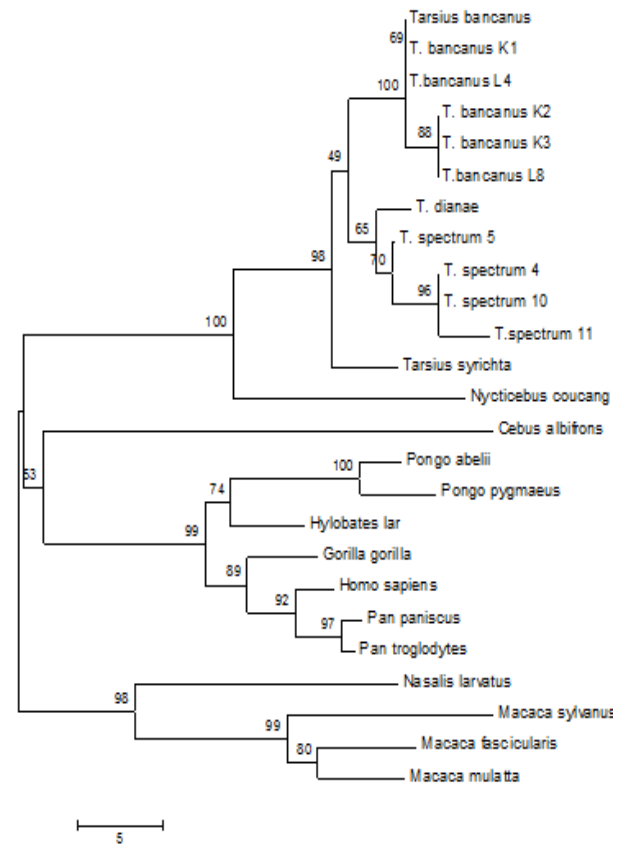
adalah antara *T. bancanus* K1 dan *T. bancanus* L8; antara *T. bancanus* K2, *T. bancanus* K3, dan *T. bancanus* L8; serta antara *T. spectrum* 4 dan *T. spectrum* 10. Semakin besar jarak genetika dan semakin banyak asam amino yang berbeda menunjukkan bahwa kekerabatan satwa tersebut semakin jauh, dan sebaliknya semakin kecil jarak genetika dan semakin kecil jumlah asam aminonya berarti semakin dekat kekerabatannya. Rata-rata jarak genetika *Tarsius* sp. berdasar urutan nukleotida gen COX1 pada penelitian ini adalah 8,3 %, sedangkan apabila dibandingkan dengan penelitian sebelumnya ternyata urutan nukleotida gen *cyt b* (Widayanti *et al.*, 2006) dan ATP8 (Widayanti, 2010) memiliki jarak genetika yang lebih besar yaitu berturut-turut 13,1 dan 13,4 %. Namun ketiga urutan nukleotida gen tersebut sudah dapat digunakan sebagai penanda genetik *T. bancanus*, *T. spectrum*, dan *T. diana*, walaupun pada tingkat asam amino gen tersebut kurang memberikan hasil yang memuaskan. Oleh karena itu, masih perlu dilakukan penelitian pada gen-gen lain yang kemungkinan dapat digunakan sebagai penanda genetika spesies-spesies *Tarsius*.

Jarak genetik berdasar nukleotida dan adanya perbedaan asam amino pada gen COX1 ketiga spesies tarsius tersebut dapat dibuat pohon filogenetika menggunakan metode *Neighbor joining* dengan 1000x pengulangan (dalam program MEGA v. 5). Pohon filogenetik berdasar urutan nukleotida dan asam amino disajikan pada Gambar 2 dan Gambar 3.



Gambar 2. Pohon filogenetika *Tarsius* sp. berdasar urutan nukleotida (1544 nt) menggunakan metode Neighbor joining dengan bootstrap 1000x

Gambar 2 dan Gambar 3 merupakan pohon filogenetika *Tarsius* sp. dengan primata lain yang diambil dari Genbank. Gambar 2 berdasarkan urutan nukleotida, sedangkan Gambar 3 berdasarkan urutan asam amino penyusun COX1. Pada Gambar 2 dan 3 terlihat bahwa *Tarsius* berada dalam percabangan yang memiliki 2 subcabang, subcabang ke-1 terdiri atas semua sampel penelitian dan *T. bancanus* (Genbank), sedangkan subcabang ke-2 terdapat *T. syrichta* (Genbank), berturut-turut didukung oleh nilai bootstrap 100 dan 98%. Di antara *Tarsius* yang diteliti, berdasarkan urutan nukleotida dan urutan asam amino tampak bahwa *T. bancanus* asal Lampung dan *T. bancanus* asal Kalimantan berada dalam percabangan yang sama, yang menunjukkan bahwa kedua *T. bancanus* tersebut sangat dekat kekerabatannya, sehingga urutan nukleotida maupun asam amino dari COX1 tidak dapat sebagai penanda genetik untuk *T. bancanus* dari dua lokasi yang berbeda. Antara *T. spectrum* dan *T. diana* tampak berada dalam percabangan yang berbeda dengan *T. bancanus*, menunjukkan bahwa kekerabatan kedua spesies tarsius tersebut terhadap *T. bancanus* adalah sangat jauh. Data ini juga didukung dengan jarak genetika antara *T. bancanus* terhadap *T. spectrum*, dan *T. diana* yang besar yaitu berkisar antara 7,7-16,1%. Antara *T. diana* dan *T. spectrum* juga berada pada subcabang yang berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa kekerabatan di antara kedua spesies tersebut juga cukup tinggi, yang



Gambar 3. Pohon filogenetika *Tarsius* sp. berdasar urutan asam amino (514 aa) COX1 menggunakan metode Neighbor joining dengan bootstrap 1000x

berarti juga bahwa urutan nukleotida dan asam amino COX1 dapat sebagai penanda genetika *T. bancanus*, *T. spectrum*, dan *T. diana*. Hasil penelitian ini menguatkan penelitian sebelumnya yang telah melakukan pembagian spesies *Tarsius* berdasarkan morfologi dengan didukung dengan data vokalisasi yang mengelompokkan *Tarsius* ke dalam lima spesies, yaitu *T. pumilus*, *T. diana*, *T. spectrum*, *T. bancanus*, dan *T. syrichta* (Musser dan Dagosto, 1987; Niemitz *et al.*, 1991).

Menurut (Napier dan Napier, 1983), berdasarkan morfologi, sampai saat ini *Tarsius* masih menjadi perdebatan termasuk subordo Prosimian (sekarang sekarang Strepsirrhini) atau *intermediate* (di pertengahan) antara subordo Anthropoidea (sekarang disebut Haplorrhini) dan Prosimian, karena menunjukkan ciri-ciri di antara keduanya. Ciri-ciri yang sama dengan Strepsirrhini yaitu *nocturnal*, mata besar, telinga dapat digerakkan, mandibula tersusun dari dua tulang, serta mempunyai toilet claw pada jari kaki kedua dan ketiga. Ciri-ciri yang sama dengan Haplorrhini adalah tanpa rhinarium telanjang, tanpa *dental comb*, cermin hidung kering, gigi seri bawah menghadap ke atas, dan plasenta *hemochorial*. Demikian juga hasil yang diperoleh pada penelitian ini, pohon filogenetika berdasar urutan nukleotida gen COX1 menempatkan *Tarsius* sp. ke dalam subordo Strepsirrhini, tetapi berdasarkan urutan asam amino COX1 *Tarsius* sp. terletak di pertengahan (*intermediate*) antar subordo Strepsirrhini dan Haplorrhini. Oleh karena itu, masih diperlukan penelitian pada daerah atau gen lain untuk mengungkap perdebatan mengenai afiliasi *Tarsius* terhadap primata lainnya.

KESIMPULAN

Gen COX1 *T. bancanus*, *T. diana*, dan *T. spectrum* terdiri dari 1544 nukleotida, terdapat 240 situs nukleotida dan 16 situs asam amino yang berbeda. Jarak genetik menggunakan Kimura-2 parameter paling tinggi 16,1%, paling kecil 0%, dan rata-rata 8,6%. Pohon filogenetika menggunakan metode *Neighbor joining* berdasarkan urutan nukleotida dan asam amino COX1 dapat membedakan antara *T. bancanus*, *T. spectrum* dan *T. diana*, namun tidak dapat membedakan antara *T. bancanus* asal Kalimantan dan *T. bancanus* asal Lampung. Pohon filogenetika berdasarkan urutan nukleotida mengelompokkan *Tarsius* dalam subordo

Strepsirrhini, sedangkan berdasar urutan asam amino COX1 mengelompokkan *Tarsius* di pertengahan (*intermediate*) antara subordo Strepsirrhini dan Haplorrhini.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Dikti melalui Penelitian Multidisiplin Tahun 2012 yang telah memberi dukungan dana untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Kane, R.A., J.R. Stothard, A.M. Emery, and D. Rollinson. 2008. Molecular characterization of freshwater snails in the genus *Bulinus*: a role for barcodes?. *Parasites & Vectors* 1:15. <http://www.parasitesandvectors.com/content>
- Musser, G.G. and M. Dagosto. 1987. The identity of *Tarsius pumilus*, a pygmy species endemic to the montane mossy of Central Sulawesi. *Am. Museum Novitates*. 2867:1-53.
- Napier, J.R. and P.H. Napier. 1983. *The Natural History of the Primates*. British Museum (Natural History), Cromwell Road, London.
- Nei, M. and S. Kumar. 2002. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 5.0*. Pennsylvania State University, Pennsylvania.
- Niemitz, C., A. Nietsch, S. Warter, and Y. Rumpler. 1991. *Tarsius diana*: A new primate species from Central Sulawesi (Indonesia). *J. Folia Primatol.* 56:105-116.
- Özgül, F. and F. İlhan. 2012. Phylogenetic relationship of Turkish *Apis mellifera* subspecies based on sequencing of mitochondrial cytochrome C oxidase I region. *Genet. Mol. Res.* 11(2):1130-1141
- Park, G.M., K.I. Im, and T.S. Yong. 2003. Phylogenetic relationship of ribosomal ITS2 and mitochondrial COI among diploid and triploid *Paragonimus westermani* isolates. *Korean J. Parasitol.* 41(1):47-55.
- Schmitz, J., M. Ohme, and H. Zischler. 2002. The complete mitochondrial sequence of *Tarsius bancanus*: Evidence for an extensive nucleotide compositional plasticity of primate mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol. Evol.* 19:544-553.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, Position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* 22:4673-4680.
- Widayanti, R. 2010. Kajian molekuler gen *ATP synthase FO* subunit 8 (*ATP8*) pada DNA mitokondria *Tarsius* sp. *Media Kedokteran Hewan* 26(3):174-182.
- Widayanti, R. dan D.D. Solihin. 2007. Kajian penanda genetika *Tarsius bancanus* dan *Tarsius spectrum* dengan urutan *D-Loop* parsial DNA mitokondria. *Biota* 12(3):170-176.
- Widayanti, R., D.D. Solihin, D. Sajuthi, dan D. Perwitasari. 2006. Kajian penanda genetika gen *cytochrome B* pada *Tarsius* sp. *J. Sain Vet.* 24(1):1-8.
- Widayanti, R., N.S.H. Handayani, dan I.M. Budiarsa. 2010. Kajian molekuler *Tarsius* sp. pada gen penyandi *cytochrome oxidase* sub-unit 2 (*COX2*) mitokondria. *Biota* 15(1):98-106.